OIPE IAP45 SEP 22 2005 PATENT & TRADEMARK OFFICE

BEST AVAILABLE COPY

Attorney Docket No. 1877.1001

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Patent Application of:

Tai-Wha CHUNG et al.

Application No.: 10/540,848 Group Art Unit: Not Yet Assigned

Filed: June 27, 2005 Examiner: Not Yet Assigned

For: Monoclonal Antibody Against Asialo Alpha 1-Acid Glycoprotein, Immunochromatographic Strip Comprising The Monoclonal Antibody, And Method For Diagnosing Liver Diseases Using The Immunochromatographic Strip

SUBMISSION OF CERTIFIED COPY OF PRIOR FOREIGN APPLICATION IN ACCORDANCE WITH THE REQUIREMENTS OF 37 C.F.R. § 1.55

Commissioner for Patents
PO Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

In accordance with the provisions of 37 C.F.R. § 1.55, the Applicants submit herewith a certified copy of the following foreign application:

Korean Priority Document Patent Application No(s). 2002-0084834

Filed: December 27, 2002

It is respectfully requested that the applicant(s) be given the benefit of the foreign filing date(s) as evidenced by the certified papers attached hereto, in accordance with the requirements of 35 U.S.C. § 119.

Respectfully submitted,

STAAS & HALSEY LLP

Date: September 22, 2005 By: Darleen J. Stockley

Darleen J. Stockley
Registration No. 34,257

1201 New York Ave, N.W., Suite 700
Washington, D.C. 20005
Telephone: (202) 434-1500
Facsimile: (202) 434-1501

대한민국특허청
KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출 원 번 호 :
Application Number
10-2002-0084834

출 원 년 월 일 :
Date of Application
2002년 12월 27일
DEC 27, 2002

출 원 인 :
Applicant(s)
네오바이오다임 주식회사
NEOBIODIGM CO., LTD.

2005 년 07 월 06 일

특 허 청
COMMISSIONER

CERTIFIED COPY OF PRIORITY DOCUMENT

CERTIFIED COPY OF PRIORITY DOCUMENT

【서지사항】

【서류명】 특허출원서

【권리구분】 특허

【수신처】 특허청장

【제출일자】 2002.12.27

【발명의 국문명칭】 아사이알로 α1-산 당단백질에 대한 단일클론 항체, 이 항체를 포함하는 아사이알로 α1-산 당단백질 측정용 면역크로마토그래피 스트립 및 이 스트립를 이용한 간 질환 검진 방법

【발명의 영문명칭】 Monoclonal antibody against asialo α1-acid glycoprotein, immunochromatographic strip comprising the monoclonal antibody, and method for diagnosing liver diseases using the immunochromatographic strip

【출원인】

【명칭】 주식회사 코비아스

【출원인코드】 1-2000-033274-0

【대리인】

【성명】 박원용

【대리인코드】 9-1999-000503-9

【포괄위임등록번호】 2000-039817-6

【대리인】

【성명】 이종우

【대리인코드】 9-1998-000393-3

【포괄위임등록번호】 2000-039816-9

【발명자】

【성명의 국문표기】 정태화

【성명의 영문표기】 CHUNG,Tai Wha

【주민등록번호】 360123-1025015

【우편번호】 300-766

【주소】 대전광역시 동구 용전동 신동아아파트 12-1301

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 송은영

【성명의 영문표기】 SONG,Eun Young

【주민등록번호】 630725-2066918

【우편번호】 150-010

【주소】 서울특별시 영등포구 여의도동 한성아파트 C-1001

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 강지현

【성명의 영문표기】 KANG,Ji Hyun

【주민등록번호】 751130-2852011

【우편번호】 302-121

【주소】 대전광역시 서구 둔산1동 1380-1 아너스빌 1013호

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 김경아

【성명의 영문표기】 KIM,Kyoung A

【주민등록번호】 680911-2249114

【우편번호】 306-030

【주소】 대전광역시 대덕구 비래동 태종아트빌라 가-201

【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 이은영

【성명의 영문표기】 LEE,Eun Young

【주민등록번호】 760513-2691412
【우편번호】 305-333
【주소】 대전광역시 유성구 어은동 101-2 아트빌라 205호
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 최용경
【성명의 영문표기】 CHOE,Yong Kyung
【주민등록번호】 570320-1821521
【우편번호】 300-768
【주소】 대전광역시 동구 용전동 한숲아파트 103-1504
【국적】 KR
【심사청구】 청구
【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사 를 청구합니다. 대리인
박원용 (인) 대리인
이종우 (인)
【수수료】

【기본출원료】	20 면	29,000 원
【가산출원료】	13 면	13,000 원
【우선권주장료】	0 건	0 원
【심사청구료】	20 항	749,000 원
【합계】	791,000 원	

【첨부서류】 1.요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 간질환을 검진하는 면역분석 분야에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 아사이알로 α_1-산 당단백질[이하, AsAGP(asialo α_1-acid glycoprotein)라 약칭함]에 대해 특이적 반응성을 나타내는 단일클론 항체, 이 항체를 이용하여 생물학적 시료 중 AsAGP의 농도를 측정함으로써 간 질환의 가능성 여부를 조기에 검사하는 방법, 시료 중 AsAGP의 농도를 측정하여 신속하고 간편하게 간 질환 가능성 여부를 조기에 검사하는데 유용한 본 발명의 AsAGP 단일클론항체를 고정시킨 GF 멤브레인과 리시누스 코뮤니스 아글루티닌(Ricinus communis agglutinin: RCA)를 고정시킨 NC 멤브레인을 함유하는 것이 특징인 면역크로마토그래피 스트립 및 본 발명의 AsAGP 단일클론 항체를 고정시킨 고상체(예, 마이크로플레이트)를 포함하는 것이 특징인 간 질환 진단 킷트에 관한 것이다. 이와 같은 본 발명의 AsAGP 단일클론 항체, 이 항체와 렉틴 RCA를 함유하는 면역크로마토그래피 스트립 및 면역분석용 진단 킷트를 사용하면 혈청에서 아사이알로 α_1-산 당단백질을 측정하여 간 질환을 조기에 신속하고 간편하게 검사할 수 있다.

【대표도】

도 5

【색인어】

아사이알로 α1-산 당단백질, As16.89 항체, 단일클론 항체, 융합세포주, 면역크로마토그래피 스트립, 면역분석용 진단킷트

【명세서】

【발명의 명칭】

아사이알로 α1-산 당단백질에 대한 단일클론 항체, 이 항체를 포함하는 아사이알로 α1-산 당단백질 측정용 면역크로마토그래피 스트립 및 이 스트립를 이용한 간 질환 검진 방법{Monoclonal antibody against asialo α1-acid glycoprotein, immunochromatographic strip comprising the monoclonal antibody, and method for diagnosing liver diseases using the immunochromatographic strip}

【도면의 간단한 설명】

<1> 도 1은 혈장으로부터 분리 정제한 α_1-산 당단백질(AGP, α_1-acid glycoprotein) 및 사이알산이 제거된(desialylated) 아사이알로 α_1-산 당단백질을 전기영동(sodium dodecyl polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE))한 결과이다.

<2> 도 2는 본 발명의 융합 세포주가 생산하는 아사이알로 α_1-산 당단백질에 대한 단일클론항체를 확인하는 웨스턴 블랏팅 결과를 나타낸 것이다.

<3> 도 3은 본 발명에서 제조한 단일클론항체가 아사이알로 α_1-산 당단백질에만 반응하고 햅토글로빈(heptoglobin), α_2-마크로글로불린(α_2-macroglobulin)에는 반응하지 않음을 효소면역학 방법으로 나타낸 결과이다.

<4> 도 4a는 제작된 면역크로마토그래피 스트립의 평면도이다.

<5> 도 4b는 제작된 면역크로마토그래피 스트립의 정면도이다.

<6> 도 5는 본 발명에 따른 카세트형 면역크로마토그래피 스트립에 의해 측정되는 아사이알로 α_1-산 당단백질의 농도별 측정 결과를 나타낸 것이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<7> 본 발명은 신속하고 간편한 조기 간 질환 검사에 관한 것으로, 보다 상세하게는 아사이알로 α_1-산 당단백질에 대한 단일클론 항체, 이 항체를 이용하여 시료 중 아사이알로 α_1-산 당단백질의 농도를 측정함으로써 간 질환 가능성 여부를 검사하는 방법 및 시료 중 아사이알로 α_1-산 당단백질의 농도를 측정하여 신속하고 간편하게 간 질환 가능성 여부를 검사하는데 유용한 아사이알로 α_1-산 당단백질에 대한 단일클론 항체와 리시누스 코뮤니스 아글루티닌(Ricinus communis agglutinin: RCA)을 함유하는 면역크로마토그래피 스트립에 관한 것이다.

<8> 간염, 간경변, 간암 등을 포함한 간 질환은 한국, 일본, 대만, 중국, 대부분의 동남아 국가에서 단일 질병으로는 가장 많은 환자가 발생하고 있으며, 현재는 간 질환 진단 시 요 중 빌리루빈(bilirubin)이나 우로빌리노겐(urobilinogen)의 검출정도를 보거나, 혈액 중 GOT(glutamic-oxaloacetic transaminase), GPT(glutamic

pyruvic transaminase), 총 빌리루빈, 알부민, 단백질, 유산 탈수소효소 등의 양을 측정하여 생화학적 성분 변화를 보거나, B형 간염 바이러스(HBV) 또는 C형 간염 바이러스(HCV)의 항원 또는 항체를 탐지하여 간 질환을 진단하고 있다. 그 외에도 간암 진단에는 알파-페토 단백질(alpha-feto protein, AFP) 및 암태아성 항원(carcinoembryonic antigen; CEA) 검사가 이용되고 있다. 그러나 간장은 복잡한 여러 기능을 지니고 있으며, 간장의 이상을 쉽게 감지하지 못하는 생체적인 특이성이 존재하고, 간 질환을 조기 진단하는 기술 미비로 인하여 간 질환이 크게 악화된 후 진단되는 경우가 많아서 간 질환 치료에 어려움이 있다.

<9> 본 연구자들은 간 질환의 조기 임상진단과 간 질환 환자에 대한 질병의 진행 상황을 정확하게 반영해 주는 간 질환의 표식자(marker)를 발굴하여 진단킷트화하고 간 질환 진단제로서의 우수성을 특허와 논문을 통해 발표한 바 있다. 구체적으로 설명하면, 본 발명자들은 특허 (PCT 출원, PCT/KR00/00840 (2000. 8. 1), 미국 출원 09/662,363 (2000.9.13), 한국 출원 10-2000-0040609 (2000.7.14))에서 항체와 렉틴을 이용한 샌드위치방법에 의해 혈 중 아사이알로당단백질을 측정하여 간 기능 진단 또는 간 질환 치료에 사용할 수 있는 재현성 있고 정확한 측정방법과 킷트를 제시한 바 있다.

<10> 일반적으로, 아사이알로당단백질은 간 질환의 진행상태를 반영하는 혈청 내 표식자로 보고되어 있다(T.Sawamura, etal. Gastroenterology, 1981;81:527~533., T.Sawamura,etal, Gastroenterology, 1984:87;1217~1221.). 또한 간암의 경우 혈 중 아사이알로당단백질의 농도와 간암 조직의 크기가 정비례함을 보여 아사이알

로당단백질은 간암의 상태를 평가하는 데 도움을 주는 표식자임이 밝혀져 있다(T.Sawamura, etal, Gastrologia Japonica, 1985:20;201~208.).

<11> 종래에는, 아사이알로당단백질의 농도를 측정하기 위해 아사이알로당단백질 수용체를 인체 또는 다른 동물(토끼, 쥐 등)에서 분리, 정제하여 포획 단백질로 사용하고, 방사선 표지 기질을 사용하여 경쟁적 방사능수용체 분석방법(competitive radioreceptor assay) 또는 전기면역확산방법(electroimmunodiffusion)을 실시하였다(J.S.Marshall, etal . J. Lab. Clin. Med., 1978;92:30-37, N. Serbource-Goguel, etal. Hepatology, 1983;3:356-359). 그러나, 아사이알로당단백질 수용체는 아사이알로당단백질 측정 킷트의 개발에 필요한 양만큼 충분히 확보하기가 어렵고, 또한 경쟁적 방사능수용체 분석방법의 경우, 방사선 물질을 사용하여야 하므로 방사선 피폭의 위험이 있고 폐기물 처리에 특별한 시설을 필요로 하는 등 여러 가지 어려움이 있으며, 전기면역확산방법의 경우에는 정량분석이 어렵다는 문제점들이 있다. 특히, 경쟁적 측정방법(competitive assay)은 정밀도와 재현성이 낮아서 일반적으로 사용되는 진단 킷트에는 적합하지 않다.

<12> 이에, 본 발명자들은 상기와 같은 종래 기술들의 문제점들을 해결하고, 보다 신속하고 일반인들도 손쉽게 아사이알로당단백질을 측정하여 간 질환의 가능성 여부를 판단할 수 있도록 하기 위하여 아사이알로 α_1-산 당단백질(AsAGP)에 대한 단일클론 항체를 생산하고 이를 이용하여 간 질환의 가능성 여부를 검사하는 방법 및 이 방법에 사용하기 위한 면역크로마토그래피 스트립을 개발하고자 하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<13> 본 발명은 신속하고 간편하게 간 질환의 가능성 여부를 검사하기 위한 수단과 방법을 제공하기 위한 것이다.

【발명의 구성】

<14> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 간 질환 발병시 혈청 안에 과량으로 존재하는 아사이알로당단백질 가운데 아사이알로 α_1-산 당단백질에만 반응하고 햅토글로빈(heptoglobin)과 α_2-마크로글로불린(α_2-macroglobulin)에는 반응하지 않는 단일클론 항체를 제공한다. 또한, 이 단일클론 항체는 아사이알로 햅토글로빈 또는 아사이알로 α_2-마크로글로불린에도 반응하지 않는 것을 특징으로 한다. 바람직한 양태로서, 상기 단일클론 항체는 소단위형이 IgG_1 인 것이다.

<15> 단일클론 항체를 제조하는 방법은 당해 기술분야에 공지된 방법에 따라 실시할 수 있다[예컨대, Davidson, R.L. and P.S. Gerald. 1976. Improved techniques for the induction of mammalian cell hybridization by polyethylene glycol. *Somatic Cell Genet.* 2:165-176; Knott, C. L., Kuus-Reichel, K., Liu, R., & Wolfert, R. L.(1997). Development of antibodies for diagnostic assays. In Price, C., & Newman, D.(eds.), *Principles and Practice of Immunoassay, 2d ed.* New York, Stockton Press, 36-64; Gillete, R. W. 1987. Alternatives to pristane priming for ascitic fluid and monoclonal antibody production. *J.*

Immnol. Meth. 99. 21-23; Norwood, T.H. C.J. Zeigler, and G.M. Martin. 1976. Dimethyl sulphoxide enhances polyethylene glycol-mediated somatic cell fusion. *Somatic cell Genter.* 2: 263-270]. 예를 들어 아사이알로 α_1-산 당단백질을 분리하여 생쥐를 면역화시킴으로써 얻을 수 있다.

<16> 이와 같이 얻은 단일클론 항체를 대량생산하기 위해서는, 통상의 방법에 따라 융합세포주를 제조하여 분리 선별한 후, 이 융합세포주를 생쥐에 주사하여 생쥐의 복수액으로부터 분리 정제하여 수득할 수 있다.

<17> 보다 상세하게 설명하면, 먼저 아사이알로 α_1-산 당단백질을 예를 들어 계류중인 특허출원[PCT 출원, PCT/KR00/00840 (2000. 8. 1), 미국 출원 09/662,363 (2000.9.13), 한국 출원 10-2000-0040609 (2000.7.14)]에 기술된 바와 같이 혈액으로부터 분리한다. 이와 같이 분리된 아사이알로 α_1-산 당단백질은 인산완충액에 현탁시키고 Titer-MAX 용액과 잘 섞어서 생쥐에 면역화시킨다. 면역화된 생쥐로부터 추출한 비장세포와 마이엘로마세포를 융합하고, 효소 면역법을 이용하여 아사이알로 α_1-산 당단백질 항원에만 특이적으로 반응하는 융합세포군를 선별한다. 선별한 융합세포주로부터 아사이알로 α_1-산 당단백질에 대한 단일클론항체를 대량으로 생산하기 위하여 아사이알로 α_1-산 당단백질에 대한 단일클론항체를 생산하는 상기 융합세포를 생쥐에 주사하고 복강이 부풀어 오른 생쥐에서 고농도의 융합세포를 함유하는 복수액을 취하여 본 발명의 단일클론항체를 대량으로 얻는다.

<18> 따라서, 본 발명은 다른 관점으로서, 아사이알로당단백질 가운데 아사이알로 α_1-산 당단백질에만 반응하고 햅토글로빈(heptoglobin)과 α_2-마크로글로불린(α_2-macroglobulin)에는 반응하지 않는 단일클론 항체를 대량생산하는 융합세포주를 제공한다.

<19> 이와 같은 관점에 있어서, 상기 융합세포주로부터 얻은 아사이알로 α_1-산 당단백질에 대한 단일클론항체가 아사이알로 α_1-산 당단백질에 대한 항원 특이성이 있는가를 확인하기 위하여, 아사이알로 α_1-산 당단백질을 전기영동하고 전술한 과정으로부터 얻은 단일클론항체로 웨스턴 블랏을 수행하여 조사할 수 있다. 또한, 본 발명의 단일클론항체가 아사이알로 α_1-산 당단백질에만 반응하고 그외 당단백질에는 반응하지 않음을 확인하기 위해서는 예를 들어 효소면역분석법 등으로 조사할 수 있다(이하 실시예 2 참조).

<20> 바람직한 양태로서, 본 발명은 아사이알로 α_1-산 당단백질을 특이적으로 인식하는 소단위형(subclass type)이 IgG_1인 단일클론 항체를 생산하고, 부다페스트조약에 의거한 국제기탁기관인 한국과학기술연구원 부설 생명공학연구소(KCTC)에 2002년 5월 24일자로 기탁한 수탁번호 KCTC 10261BP의 생쥐 융합세포주를 제공한다.

<21> 또 다른 관점으로서, 본 발명은 아사이알로당단백질 가운데 아사이알로 α_1-

산 당단백질에만 반응하고 햅토글로빈(heptoglobin)과 α_2-마크로글로불린(α_2-macroglobulin)에는 반응하지 않는 단일클론 항체와 아사이알로 α_1-산 당단백질을 특이적으로 인지하는 렉틴으로서 리시누스 코뮤니스 아글루티닌(Ricinus communis agglutinin: 이하 RCA로 약칭함)을 검사할 시료와 반응시켜 간 질환 발생 시 혈액 내에서 증가하는 것으로 추정되는 아사이알로 α_1-산 당단백질(AsAGP) 양을 측정하여 간 질환의 가능성 여부를 검사하는 방법을 제공한다.

<22> 이와 같은 검사 방법에 있어서, 검사할 시료는 마이크로플레이트 웰에서의 샌드위치형 효소면역법, 면역크로마토그래피 스트립상에서의 효소면역법 등과 같이 다양한 형태의 효소면역법으로 분석할 수 있다. 특히, 면역크로마토그래피 스트립상에서의 효소면역법이 간편하다.

<23> 또한, 이 검사 방법에 사용되는 단일클론 항체는 소단위형이 IgG_1인 전술한 단일클론 항체가 바람직하다. 보다 바람직하게는, 수탁번호 KCTC 10261BP의 생쥐 융합세포주에 의해 생산되는 단일클론 항체인 것이 좋다.

<24> 또한, 아사이알로 α_1-산 당단백질을 인식하는 렉틴으로는 리시누스 코뮤니스 아글루티닌(Ricinus communis agglutinin: RCA)을 사용하는 것이 바람직하다.

<25> 다른 관점으로서, 본 발명은 시료 중 아사이알로 α_1-산 당단백질의 농도를 측정하여 신속하고 간편하게 간 질환 가능성 여부를 검사하는데 유용한 아사이알로 α_1-산 당단백질에 대해 반응성인 단일클론 항체와 아사이알로 당단백질을 인지하는

렉틴인 RCA를 함유하는 면역크로마토그래피 스트립을 제공한다.

<26> 바람직한 양태로서, 본 발명은 수탁번호 KCTC 10261BP의 단일클론 항체 As16.89와 렉틴인 RCA를 함유하는 면역크로마토그래피 스트립을 제공한다. 바람직한 구체예로서, 본 발명은 전술한 본 발명의 단일클론 항체와 골드 콜로이드가 접합 처리된 글라스화이버(GF) 멤브레인과 대조 라인과 아사이알로 α_1-산 당단백질 검출 결과의 판정 라인이 직선 처리되어 있는 나이트로셀룰로스(NC) 멤브레인, 시험하고자 하는 시료를 흡수하는 부분인 시료 패드, 시료내 미반응 물질을 흡수하는 흡수 패드, 전술한 구성 부재들이 장착되는 접착용 플라스틱 백킹을 포함하는 면역크로마토그래피 스트립을 제공한다.

<27> 본 발명의 면역크로마토그래피 스트립은 전술한 접착용 플라스틱 백킹 위에 NC 멤브레인, GF 멤브레인, 시료 패드 및 흡수 패드를 순서대로 장착하되, 물질이 모세관 현상에 의해 연속적으로 이동될 수 있도록 조립하는 것이 바람직하다. 면역크로마토그래피 스트립의 조립방법은 통상적인 스트립 제조방법에 따라 실시할 수 있다. 이와 같은 본 발명의 면역크로마토그래피 스트립은 카세트(cassette) 형태 또는 막대(stick) 형태로 제조할 수 있다.

<28> 또한, 상기 시험하고자 하는 시료는 환자의 혈액 또는 혈청, 바람직하게는 혈청을 용출 완충액으로 10배 희석하여 사용하는 것이 바람직하다. 용출 완충액으로는 5% 슈크로스(Sucrose), 1% 소혈청알부민(BSA), 1% Triton X-100을 함유하는 50mM 붕산염 완충액을 사용할 수 있다.

<29> 본 발명의 면역크로마토그래피 스트립을 이용한 검사 결과는 시료 패드에 희석된 시료를 가한 후 3 내지 5분이 지나면 대조 라인과 검출 결과 판정 라인이 발색되고, 이 발색 유무 및 발색 농도를 관찰하여 판정한다. 예를 들어, 마이크로파티클로서 Ab-골드 접합체가 사용된다면, 아사이알로 α_1-산 당단백질을 함유하는 양성 시료의 경우에는 대조 라인과 검출 결과 판정 라인에 적색의 착색선을 나타내고, 아사이알로 α_1-산당단백질이 정상적으로 함유된(간질환 환자가 아닌 정상인) 음성 시료의 경우에는 대조 라인에만 적색의 착색선을 나타낸다.

<30> 이와 같은 본 발명의 면역크로마토그래피 스트립을 이용하면 아사이알로 α_1-산 당단백질을 최저 약 1.50㎍/㎖ 농도까지 측정할 수 있어 간 질환의 조기 진단이 가능하고, 간 경화 및 간암 환자의 혈청에 존재하는 아사이알로 α_1-산 당단백질을 측정함으로써 질환의 진행정도 및 치료과정을 모니터할 수도 있다.

<31> 이상 설명드린 바와 같은 본 발명에 따르면, 아사이알로 α_1-산 당단백질에만 반응하고 햅토글로빈(heptoglobin), α_2-마크로글로불린(α_2-macroglobulin)에는 반응하지 않는 단일클론 항체 및 이를 이용하는 면역크로마토그래피 스트립 등은 조기 간질환의 가능성 여부를 간편하고 신속하게 알려줄 수 있어 간질환의 예방 및 치료 분야에 기여하는 바가 클 것으로 생각된다.

<32> 이하, 실시예에 의하여 본 발명을 상세히 설명한다.

<33> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것으로, 본 발명의 범위나 내용이 실

시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<34> 실시예 1 : 아사이알로 α_1-산 당단백질(AsAGP) 의 분리 및 정제

<35> 사람 혈장에 포함되어 있는 아사이알로당단백질중에서 α_1-산 당단백질(AGP)을 다음과 같이 분리 및 정제하였다.

<36> 사람 혈장 200 mℓ에 트롬빈 2 NIH 단위를 넣어 37℃에서 2시간, 4℃에서 하룻밤 동안 방치한 후 원심 분리하여 혈병을 제거하였다. 준비된 혈청을 0.05M 초산 나트륨 완충액(pH 4.3)으로 투석한 다음, 동일 완충액으로 평형시켜 놓은 DEAE 칼럼에 로딩하고 0.05 M 초산 나트륨 완충액(pH 4.3)과 0.1 M 초산 나트륨 완충액(pH 4.3)을 섞어 직선 비례로 증가하는 농도 구배(linear concentration gradient)로 용출시켜 280 nm에서 흡광도를 측정한 결과는 도 1과 같다. AGP와 그 외의 단백질을 함유한 분획을 모아 황산 암모늄을 0.5 g/mℓ가 되도록 넣어 단백질을 침전시킨 다음 원심 분리한 후 상층액에 다시 0.18 g/mℓ의 양으로 황산 암모늄을 넣어 단백질을 침전시켰다. 이 침전물을 소량의 증류수에 용해시킨 후 증류수로 충분히 투석하여 동결 건조시켰다.

<37> 이와 같이 분리한 AGP 40 mg을 0.1 N 황산용액 6 mℓ로 80℃에서 2시간 동안 가수분해하고 1N 수산화나트륨으로 중화시킨 다음 0.01 M 인산 완충액(pH 7.4)으로 투석하였다. 이렇게 하여 얻어진 사이알산이 제거된 α_1-산 당단백질(AsAGP) 28 mg을 세파덱스(Sephadex) G-200 칼럼에 로딩하고 0.01 M 인산 완충액(pH 7.4)으로 젤 여과(gel filtration)하고 280 nm에서 흡광도를 측정한 후 단백질을 함유한 분획을

모았다. 그 결과는 도 1과 같다. 도 1에서, 레인 1은 표준 분자량 단백질이고, 레인 2는 α_1-산 당단백질이며, 레인 3과 4는 아사이알로 α_1-산 당단백질(AsAGP)이다.

<38> 실시예 2 : 아사이알로 α_1-산 당단백질에 의한 단일클론 항체 제조

<39> (1) 생쥐에 대한 면역화

<40> 아사이알로 α_1-산 당단백질에 대한 단일클론 항체를 생산하는 융합 세포주의 제조에 필요한 면역화된 생쥐를 얻기 위하여, 아사이알로 α_1-산 당단백질 항원을 타이터-맥스(Titer-MAX)를 이용하여 50 ug/50 ml의 농도로 조절하여 유상화가 될 때까지 잘 혼합하고 생후 6 내지 8주된 Balb/c 마우스의 복강내로 주사하였다. 2주 후, 처음 주사와 같은 양을 타이터-맥스에 혼합하여 동일 부위에 재차 주사하였다. 마찬가지 방식으로 7일 후에 다시 반복 주사하고, 3주 후에 다시 반복 주사한 후 생쥐 꼬리 부위의 혈관에서 소량의 피를 채혈하여 역가를 확인하였다.

<41> (2) 세포 융합

<42> 융합 세포의 제조에 필요한 세포 융합을 실시하기 위하여, 상기 아사이알로 α_1-산 당단백질 항원으로 면역화시킨 생쥐로부터 채취한 비장 세포 10^8개와 마이엘로마(myeloma) 세포(SP2/0) 10^7개를 충분히 세척하여 혼합한 후, 여기에 1㎖의 PEG 1500을 약 1분간에 걸쳐 넣고 1분 동안 약간 흔들어 주었다. 그 후 9 ㎖의 RPMI를

약 3분간에 걸쳐 첨가하고, 총 50㎖가 될 때까지 흔들어 주면서 서서히 RPMI를 첨가하였다. 이 현탁액을 원심분리한 후, 수득된 세포 펠릿(cell pellet)을 HAT 배지에 $1\sim2x10^5$/㎖ 정도로 재현탁시키고, 96 마이크로타이터 플레이트(microtiter plate)의 각 웰에 0.2㎖씩 넣은 후, 37℃의 CO_2 습도 배양기 안에서 배양하였다.

<43> (3) 단일클론 항체를 생산하는 융합 세포의 선별

<44> 아사이알로 α_1-산 당단백질에만 특이적으로 반응하는 융합 세포를 선별하기 위해, 아사이알로 α_1-산 당단백질을 코팅한 마이크로플레이트를 이용한 엘리자(ELISA) 분석방법으로 다음과 같이 스크리닝하였다. 마이크로플레이트에 아사이알로 α_1-산 당단백질 항원을 웰 당 각각 100㎕(1㎍/㎖)씩 가하여 플레이트 표면에 부착시키고, 반응하지 않은 항원은 세척하여 제거하였다. 각 웰에 융합 세포의 배양액을 100㎕씩 가하여 2시간 동안 반응시킨 후, 인산 완충 용액-트윈 20(PBST) 용액으로 충분히 세척하여 반응하지 않은 배양액을 제거하였다. 여기에 염소 항-마우스 IgG-호스래디쉬 퍼옥시다제(goat anti-mouse IgG-HRP)를 가하여 1시간 동안 실온에서 반응시킨 다음, PBST 용액으로 충분히 세척하였다. 다음 퍼옥시다제의 기질 용액으로 오르소-페닐렌다이아민(OPD)을 넣어 반응시키고, 효소면역 판독기(ELISA Reader)로 490nm에서 흡광도에 의해 반응 정도를 측정하였다.

<45> 그 결과, 아사이알로 α_1-산 당단백질 항원에 특이적으로 높은 결합력을 갖는 항체를 분비하는 융합 세포주들을 먼저 선별하였다. 이후 여러 번의 반복 실험

을 통해, 아사이알로 α_1-산 당단백질 항원에 특이적으로 반응하는 항체를 분비하는 융합 세포주를 선별한 후 단일클론이 되도록 제한 희석(limiting dilution)하여 단일클론 항체를 생성하는 융합 세포주들을 선별하여 이들 클론중 가장 높은 역가를 나타내는 2개의 클론(아사이알로 α_1-산 당단백질 1 및 아사이알로 α_1-산 당단백질 2)을 선별하여 그 상층액에 대하여 효소 면역 측정법으로 역가를 측정하고 이중 면역 확산법으로 소단위형을 분석한 결과, 이 클론들이 분비하는 항체가 각각 IgG_1과 IgM임을 확인하였다.

<46> IgG_1을 분비하는 선별된 세포주(As16.89)는 2002년 5월 24일 한국 생명공학연구원 유전자은행에 기탁하였다(수탁번호: KCTC 10261BP).

<47> (4) 단일클론 항체의 대량 생산 및 분리 정제

<48> 융합 세포로부터 단일클론 항체를 대량 생산하기 위하여, Balb/c 생쥐에 0.5 mℓ의 프리스테인(pristane)을 복강내로 주사하였다. 1주일 후에 상기 (3)에서 얻은 각각의 융합 세포들을 생쥐 1마리당 5×0^6개씩 주사하고, 복강이 부풀어 오른 생쥐로부터 복수액을 채취하였다. 이 복수액을 12,000rpm에서 원심분리하여 세포를 침전시킨 후, 상층액만을 취하여 다음 실험에 사용할 수 있도록 -20℃에서 보관하였다. 이 상층액을 단백질 G 컬럼(protein G column)에 통과시켜 아사이알로 α_1-산 당단백질에 대한 단일클론 항체를 분리 정제하였다.

<49> (5) 웨스턴 블랏팅법에 의한 아사이알로 α_1-산 당단백질 항체의 특이성을

확인하였다.

<50> 상기 (4)과정을 통해 분리 정제한 아사이알로 α_1-산 당단백질에 대한 단일클론 항체의 특이적 항원 반응성을 SDS-폴리아크릴아마이드 젤 전기영동과 웨스턴 블랏팅 방법을 사용하여 확인하였다(도 2). 웨스턴 블랏은 당해 기술분야에 널리 알려진 방법에 따라 실시하였다. 도 2에서, 레인 1은 표준 분자량 단백질이고, 레인 2는 α_1-산 당단백질이며, 레인 3은 아사이알로 α_1-산 당단백질이고, 레인 4는 α_2-마크로글로불린이며, 레인 5는 햅토글로빈이다.

<51> (6) 효소면역 화학법에 의한 단일클론 항체의 특이성 확인

<52> 아사이알로 α_1-산 당단백질, 햅토글로빈, a_2-마크로글로불린 항원을 마이크로플레이트에 웰당 각각 100㎕(1㎍/㎖)씩 가하여 플레이트 표면에 부착시킨 후, 분리 정제된 아사이알로 α_1-산 당단백질에 대한 항체를 100㎕씩 가하여 2시간 동안 반응시킨 후, 인산염 완충 용액-트윈 20(PBST) 용액으로 충분히 세척하여 반응하지 않은 배양액을 제거하였다. 여기에 염소 항-마우스 IgG-호스래디쉬 퍼옥시다제(goat anti-mouse IgG-HRP)를 가하여 1시간 동안 실온에서 반응시킨 다음, PBST 용액으로 충분히 세척하였다. 다음 퍼옥시다제의 기질용액으로 오르소-페닐렌다이아민(OPD)을 넣어 반응시키고, 효소면역 판독기(ELISA Reader)로 490nm에서 흡광도를 측정하여 반응 정도를 분석하였다. 그 결과 분리 정제된 아사이알로 α_1-산 당단백질에 대한 항체가 아사이알로 α_1-산 당단백질에 대해서 특이적인 항체임을 확인할

수 있었다(도 3). 도 3에서 AGP는 α_1-산 당단백질, AsAGP는 본 발명의 아사이알로 α_1-산 당단백질을 나타낸다.

<53> 실시예 3: 면역분석용 진단킷트를 이용한 간 질환 검사

<54> 본 실시예에서는 본 발명에 의해 생산된 혈중 아사이알로 α_1-산 당단백질 As16.89 단일클론 항체와 혈중 아사이알로 α_1-산 당단백질간의 면역 반응을 통해 시료내 아사이알로 α_1-산 당단백질 농도를 측정하는 진단킷트의 제조 및 측정방법에 대하여 설명하고자 한다.

<55> (1) 면역분석용 진단킷트의 제조

<56> 다음의 구성 요소들을 사용하여 효소면역측정법에 의한 혈중 아사이알로 α_1-산 당단백질 측정용 킷트를 제조하였다:

<57> A. 고상체(예, 마이크로플레이트)에 고정된 아사이알로 α_1-산 당단백질에 대한 항체(As16.89)

<58> B. 아사이알로 α_1-산 당단백질에 대한 렉틴(RCA)-호스래디쉬 퍼옥시다제(HRP)

<59> C. 시료 희석 용액(1% BSA/PBST)

<60> D. 효소 기질 용액(OPD)

<61> E. 세척액(PBST)

<62> F. 아사이알로 α_1-산 당단백질 표준 용액

<63> G. 반응 정지액

<64> (2) 측정 방법

<65> ① As16.89 항체가 고정된 마이크로플레이트의 웰에 농도를 알고 있는 아사이알로 α_1-산 당단백질 표준 용액(1㎍/㎖)을 100 ㎕씩 차례로 분주하고, 정상인 41명, 비간질환자 155명, 급성간염환자 36명, 만성간염(CH) 환자 272명, 간경변(LC) 환자 230명, 간경변에서 간암(HCC)으로까지 진행된 환자 72명의 혈청을 카톨릭대학교 부속 성모병원로부터 공급받아 1:10의 비율로 희석 용액에 희석하여 웰에 100㎕씩 차례로 분주한 후, 상온에서 120분 동안 반응시켰다.

<66> ② 반응 후, 세척액을 웰당 100 ㎕씩 첨가하여 3반복 세척하였다.

<67> ③ 세척한 플레이트의 웰에, 제조법에 따라 희석한 렉틴(RCA)-HRP을 100 ㎕씩 분주하고 상온에서 60분 동안 반응시켰다.

<68> ④ ②의 과정을 반복하였다.

<69> ⑤ 세척한 플레이트의 각 웰에 효소 기질 용액(OPD)을 100 ㎕ 씩 분주하고 10분 동안 반응시켰다.

<70> ⑥ 각 반응 웰에 반응 정지액을 100 ㎕ 씩 넣어 효소 반응을 정지시켰다.

<71> ⑦ 효소면역 판독기(ELISA Reader)를 이용하여 흡수 파장 490 nm에서 시료의 흡광도를 측정하였다.

<72> 위의 방법에 따라 혈중 아사이알로 α_1-산 당단백질을 측정한 결과 하기 표 1과 같은 결과를 확인하였다.

【표 1】

<73> 혈중 AsAGP 측정치 [결정값(cutoff) : 1.50 ug/ml]

구 분		합계	평균±SD (ug/ml)*	AsAGP>1.50ug/ml		AsAGP<1.50ug/ml	
				피검체수	%	피검체수	%
대조군	소 계	196	0.89×.46	19	10.0	177	90
	정상	41	0.84×.41	2	5	39	95
	비간질환	155	0.90×.48	17	11	138	89
간질환군1	급성간염	36	1.33×.77	9	25	27	75
간질환군2	소 계	574	2.48×.89	323	56	251	44
	만성간염 (CH)	272	1.63×.45	99	36	173	64
	간경변 (LC)	230	3.12×.42	165	72	65	28
	간경변(LC)이 있는 간암 (HCC)	72	3.64×.01	59	82	13	18

<74> 면역분석결과, 정상인과 비간질환자의 혈중 아사이알로 α_1-산 당단백질의 농도가 평균 1.00 μg/ml 미만으로 측정되고, AsAGP 농도가 1.50μg/ml 이상인 피검체수가 약 10% 이하였으며, 급성간염, 만성간염, 간경변 및 간경변이 있는 간암환자의 경우에는 혈중 AsAGP 농도가 각각 평균 1.33μg/ml, 1.63μg/ml, 3.12μg/ml 및 3.64μg/ml으로 측정되고 AsAGP 농도가 1.50μg/ml 이상인 피검체수가 각각 25%, 36%, 72% 및 82%로, 비율의 차이는 있으나 대조군과 비교했을 때 뚜렷한 농도 차이를 나타내는 바, 간질환 양성 판정에 유효성이 있음을 확인하였다.

<75> 이상과 같은 결과로부터, 본 발명의 As16.89 항체를 이용한 효소면역분석시 간질환 판정의 결정값(cutoff)을 1.50μg/ml으로 결정하였다.

<76> 실시예 4: 면역크로마토그래피 스트립 제조

<77> (1) 단일클론 항체 Ab-골드 접합체 제조

<78> 본 발명에서 선별한 아사이알로 α_1-산 당단백질에 대해 반응성인 단일클론 항체 Ab를 콜로이드성 골드 입자 용액에 15㎍/㎖ 가한 후 실온에서 2시간 회전시키면서 반응시킨 후 10% BSA를 1/10 부피로 가하여 1% 농도가 되도록 한 후 다시 1시간 동안 반응시켜 Ab-골드 접합체를 제조하였다. 12,000 rpm에서 40분간 원심분리하여 상등액을 버리고 다시 2mM 붕산염 완충액을 가하여 Ab-골드 접합체를 세척하였다. 이와 같은 세척을 3회 실시하였다. 마지막 세척 후에 1% BSA를 함유한 2 mM 붕산염 완충액을 골드 용액의 약 1/10 부피로 가해서 현탁시켰다. UV 분광분석기로 530 nm에서 흡광도를 측정한 후 측정값이 3.00이 되도록 희석하여 사용하였다.

<79> (2) 시료 패드

<80> 시험하고자 하는 시료를 흡수하기 위한 부분으로서, 셀룰로스 소재로 된 것을 사용하였다.

<81> (3) 글라스화이버(GF) 멤브레인

<82> 시료내 AsAGP와 본 발명에 따라 제조된 단일클론 항체간의 면역 반응이 일어나는 부분으로 GF 멤브레인 표면상에 골드 콜로이드 미립자-As16.89 항체가 일시 고정되어 있으며, 그 제조 방법은 다음과 같다.

<83> 제조된 하이브리도마 세포 As16.89로부터 생산된 단일클론 항체를 상기 (1)에서 제시된 바와 같이 접합하였다.

<84> GF 멤브레인(Milipore사 제품, 1.0cm x 0.7cm)을 20mM 붕산 나트륨 완충액에 충분히 적시어 건조시킨 후, 상기에서 제조한 골드 콜로이드 미립자-As16.89 항체를 GF 멤브레인에 고르게 분무하고 37℃에서 건조시켜 표면상에 착색 미립자 고상형 항체가 일시 고정된 면역 반응 패드용 GF 멤브레인(접합체 패드라고도 함)을 제조하였다.

<85> (4) 나이트로셀룰로스(NC) 멤브레인 및 라인(line) 처리

<86> 나이트로셀룰로스 멤브레인(Millipore사)을 적당한 크기(0.7cm x 5cm)로 자른 후, 플라스틱 백킹 하단에서 약 3.4 cm 되는 지점에 대조 라인으로서 염소 항-마우스 IgG(goat anti-mouse IgG)를 직선 처리하고, 2.7 cm 되는 지점에 아사이알로 α_1-산 당단백질 검출 결과 판정 라인으로서 RCA(EY Lab)를 직선 처리한 다음, 건조시켜 NC 멤브레인을 제조하였다.

<87> (5) 흡수(absorbent) 패드

<88> 면역 반응후 시료내 미반응 물질들을 흡수하고, 이에 따라 분석 물질을 포함한 시료 용액이 모세관 현상에 의해 이동되도록 하는 역할을 하도록 셀룰로즈 멤브레인을 사용하였다.

<89> (6) 면역크로마토그래피 스트립 제조

<90> 도 4a와 도 4b에 제시된 바와 같이, 접착용 플라스틱 백킹위에 NC 멤브레인, GF 멤브레인, 시료 패드 및 흡수 패드를 순서대로 장착하되, 물질이 모세관 현상에 의해 연속적으로 이동될 수 있도록 0.1cm 가량 부분적으로 겹쳐지도록

배열 조립하여 접착 고정시켰다.

<91> 실시예 5: 면역크로마토그래피 스트립을 이용한 아사이알로 α_1-산 당단백질의 농도별 분석시험

<92> 실시예 4에서 제조한 면역크로마토그래피 스트립의 시료 패드에 용출완충액(예, 5% 슈크로스(Sucrose), 1% 소혈청알부민(BSA) 또는 1% Triton X-100을 함유하는 50 mM 붕산염 완충액)으로 1:10 비율로 희석시킨 혈청 시료 용액을 60 내지 70 ㎕ 가하고, 3 내지 5분 후 대조라인과 판정 라인의 착색 유무를 관찰하였다.

<93> 도 5는 카세트형 면역크로마토그래피 스트립에서 판정한 결과를 도시한 것이다. 1번은 비교군으로 α_1산-당단백질(AGP), 햅토글로빈, α_2-마크로글로불린의 혼합물을 적용한 스트립이고, 2번은 정상인 혈청 시료를 적용한 스트립이며, 3번 내지 6번은 각각 아사이알로 α_1-산 당단백질을 1.5㎍/㎖, 2.0㎍/㎖, 3.0㎍/㎖ 및 4.0 ㎍/㎖ 적용한 스트립이다. 도 5를 통해 알 수 있듯이, 3번 라인에서는 미약하지만 4번 내지 6번 스트립에서는 뚜렷한 적색의 착색선을 대조 라인(상측 라인) 및 검출결과 판정 라인(하측 라인)에서 확인할 수 있었다.

<94> 본 발명의 면역크로마토그래피 스트립은 혈청 시료 분석에서 혈중 아사이알로 α_1-산 당단백질이 1.50ug/ml 미만인 정상인의 혈청 시료(음성 시료)의 경우에는 발색이 가능한 정도의 항원-항체-효소복합체 형성이 일어나지 않으므로 대조 라인에서만 적색의 착색선을 관찰할 수 있게 되지만, 간질환으로 인해 증가된 아사이알

로 α_1-산 당단백질 함량이 1.50㎍/㎖ 이상인 환자의 혈청 시료의 경우에는 시료 패드에 흡수된 시료내 아사이알로 α_1-산 당단백질이 GF 멤브레인에 포함된 골드 미립자- As16.89 항체와 면역 반응하여 복합체를 형성하고, 이 복합체는 모세관 현상에 의해 NC 멤브레인 상으로 이동하면서 NC 멤브레인 상의 판정 라인내 RCA와 결합하여 골드 침착이 일어나게 되므로, 이 검사가 정상적으로 시행되었는지를 확인해 주는 대조 라인과 함께, 총 2개의 적색선을 나타내게 된다. 또한 상기 당단백질의 농도가 증가할수록 판정 라인의 착색선의 두께와 진하기도 증가하는 바, 증가되는 검사 시료의 당단백질 농도로부터 간질환의 진행정도를 예측하는 것이 가능하다.

【발명의 효과】

<95> 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 아사이알로 α_1-산 당단백질에 대한 단일클론항체를 이용한 면역크로마토그래피 스트립과 면역분석용 진단킷트를 이용하면, 혈액중 존재하는 아사이알로 α_1-산 당단백질의 유의성 여부를 간단하고 편리하게 진단할 수 있어 간 질환을 조기진단하거나 간 질환의 진행정도를 측정하거나 치료과정을 모니터하는데 유효하게 사용할 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

아사이알로 α_1-산 당단백질에만 반응하고 햅토글로빈(heptoglobin)과 α_2-마크로글로불린(α_2-macroglobulin)에는 반응하지 않는 단일클론 항체.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 소단위형이 IgG_1인 것이 특징인 단일클론 항체.

【청구항 3】

아사이알로 α_1-산 당단백질에만 반응하고 햅토글로빈(heptoglobin)과 α_2-마크로글로불린(α_2-macroglobulin)에는 반응하지 않는 단일클론 항체를 대량생산하는 융합세포주.

【청구항 4】

제3항에 있어서, 아사이알로 α_1-산 당단백질로 면역화된 생쥐로부터 추출한 비장세포와 마이엘로마 세포를 융합하여 제조한 것인 융합세포주.

【청구항 5】

제4항에 있어서, 아사이알로 α_1-산 당단백질을 특이적으로 인식하는 소단위형(subclass type)이 IgG_1인 단일클론 항체를 생산하고, 부다페스트조약에 의거한 국제기탁기관인 한국과학기술연구원 부설 생명공학연구소(KCTC)에 2002년 5월 24일

자로 수탁번호 KCTC 10261BP로 기탁되어 있는 것인 융합세포주.

【청구항 6】

아사이알로 α_1-산 당단백질에만 반응하고 햅토글로빈(heptoglobin)과 α_2-마크로글로불린(α_2-macroglobulin)에는 반응하지 않는 단일클론 항체와 아사이알로당단백질을 인지하는 렉틴인 RCA[리시누스 코뮤니스 아글루티닌(Ricinus communis agglutinin)]를 생물학적 시료와 반응시켜 시료 중의 아사이알로 α_1-산 당단백질(AsAGP) 양을 측정함으로써 간 질환의 가능성 여부를 검사하는 방법.

【청구항 7】

제6항에 있어서, 단일클론 항체가 수탁번호 KCTC 10261BP의 생쥐 융합세포주에 의해 생산되는 소단위형이 IgG_1인 것이 특징인 간 질환의 가능성 여부를 검사하는 방법.

【청구항 8】

제6항에 있어서, 생물학적 시료가 피검체의 혈액 또는 혈청인 것이 특징인 간 질환의 가능성 여부를 검사하는 방법.

【청구항 9】

아사이알로 α_1-산 당단백질에만 반응하고 햅토글로빈(heptoglobin)과 α_2-마크로글로불린(α_2-macroglobulin)에는 반응하지 않는 단일클론 항체와 아사이알로

당단백질을 인지하는 렉틴인 RCA를 함유하여, 시료 중에 존재하는 아사이알로 α_1-산 당단백질의 농도가 1.50㎍/㎖ 이상인 경우에 반응성을 나타내는 간 질환의 가능성 여부를 검사하기 위한 면역크로마토그래피 스트립.

【청구항 10】

제9항에 있어서, 단일클론 항체가 수탁번호 KCTC 10261BP의 단일클론 항체 As16.89인 것이 특징인, 간 질환의 가능성 여부를 검사하기 위한 면역크로마토그래피 스트립.

【청구항 11】

제9항에 있어서, 단일클론 항체가 콜로이드성 골드 파티클을 포함하는 마이크로파티클에 접합된 형태로 사용되는 것이 특징인, 간 질환의 가능성 여부를 검사하기 위한 면역크로마토그래피 스트립.

【청구항 12】

제11항에 있어서, 단일클론 항체를 접합시킨 마이크로파티클이 처리된 글라스화이버(GF), 대조 라인과 당단백질 검출 결과 판정 라인이 직선 처리되어 있는 나이트로셀룰로스(NC) 멤브레인, 시험하고자 하는 시료를 흡수하는 부분인 시료 패드, 시료내 미반응 물질을 흡수하는 흡수 패드, 전술한 구성 부재들이 장착되는 접착용 플라스틱 백킹을 포함하는 간 질환의 가능성 여부를 검사하기 위한 면역크로마토그래피 스트립.

【청구항 13】

제12항에 있어서, 상기 구성 부재들이 접착용 플라스틱 백킹 위에 NC 멤브레인, GF 멤브레인, 시료 패드 및 흡수 패드의 순서대로 부분적으로 중첩되어 물질이 모세관 현상에 의해 연속적으로 이동될 수 있도록 장착되어 있고, 검출 라인인 RCA 밴드와 대조용 항체 밴드가 일정 간격을 두고 떨어져 위치하는 것을 특징으로 하는, 간 질환의 가능성 여부를 검사하기 위한 면역크로마토그래피 스트립.

【청구항 14】

제9항에 있어서, 시료는 환자의 혈액 또는 혈청을 용출 완충액으로 10배 희석한 것인, 간 질환의 가능성 여부를 검사하기 위한 면역크로마토그래피 스트립.

【청구항 15】

제14항에 있어서, 용출 완충액으로는 5% 슈크로스(Sucrose), 1% 소혈청알부민(BSA) 또는 1% Triton X-100을 함유하는 50 mM 붕산염 완충액을 포함하는 것이 특징인, 간 질환의 가능성 여부를 검사하기 위한 면역크로마토그래피 스트립.

【청구항 16】

제9항에 있어서, 면역크로마토그래피 스트립 상의 대조 라인과 검출 결과 판정 라인에 착색선이 나타나면 간 질환의 양성시료로 판정하는 것이 특징인, 간 질환의 가능성 여부를 검사하기 위한 면역크로마토그래피 스트립.

【청구항 17】

제9항에 있어서, 카세트(Cassette)의 형태로 되어 있는 것을 특징으로 하는,

간 질환의 가능성 여부를 검사하기 위한 면역크로마토그래피 스트립.

【청구항 18】

제9항에 있어서, 막대(stick)의 형태로 되어 있는 것을 특징으로 하는, 간 질환의 가능성 여부를 검사하기 위한 면역크로마토그래피 스트립.

【청구항 19】

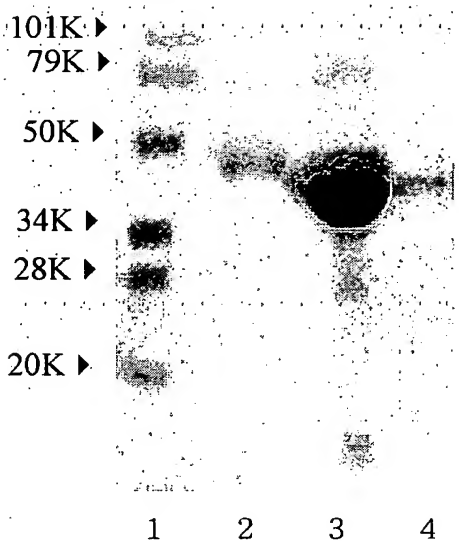
아사이알로 α_1-산 당단백질에만 반응하고 햅토글로빈(heptoglobin)과 α_2-마크로글로불린(α_2-macroglobulin)에는 반응하지 않는 단일클론 항체와 아사이알로 당단백질을 인지하는 렉틴인 RCA가 고착되어 있는 고상체를 함유하고, 시료 중에 존재하는 아사이알로 α_1-산 당단백질의 농도가 1.50㎍/㎖ 이상인 경우에 반응성을 나타내는 것을 특징으로 하는 간 질환의 가능성 여부를 검사하기 위한 면역분석용 진단킷트.

【청구항 20】

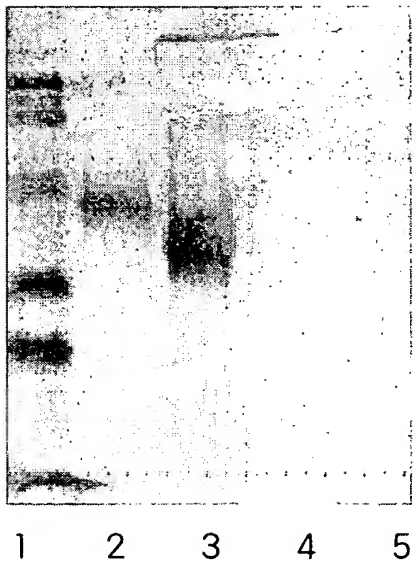
제19항에 있어서, 단일클론 항체가 수탁번호 KCTC 10261BP의 단일클론 항체 As16.89인 것이 특징인, 간 질환의 가능성 여부를 검사하기 위한 면역분석용 진단킷트.

【도면】

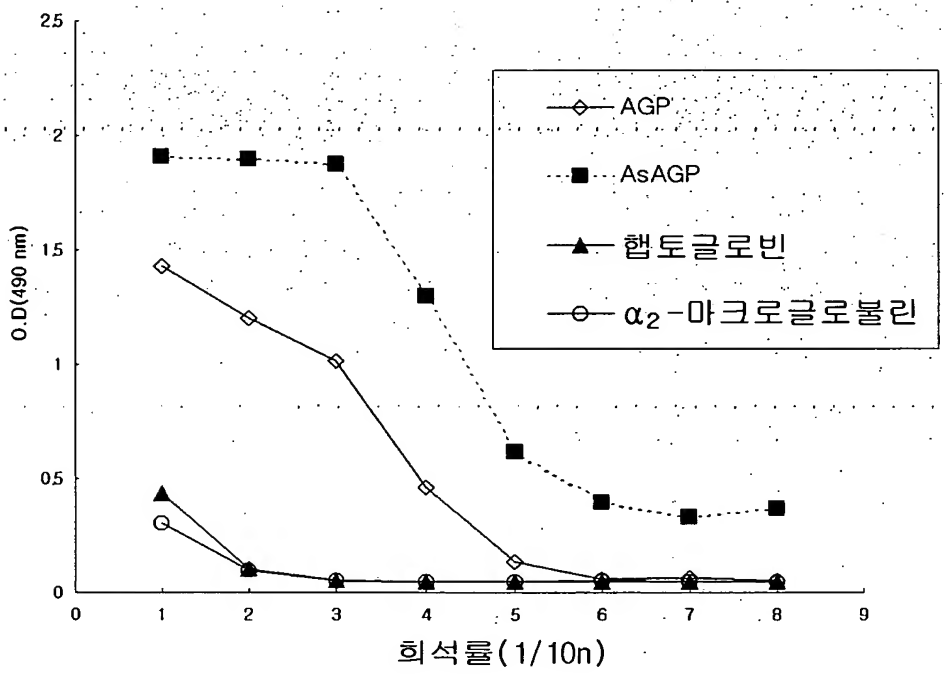
【도 1】



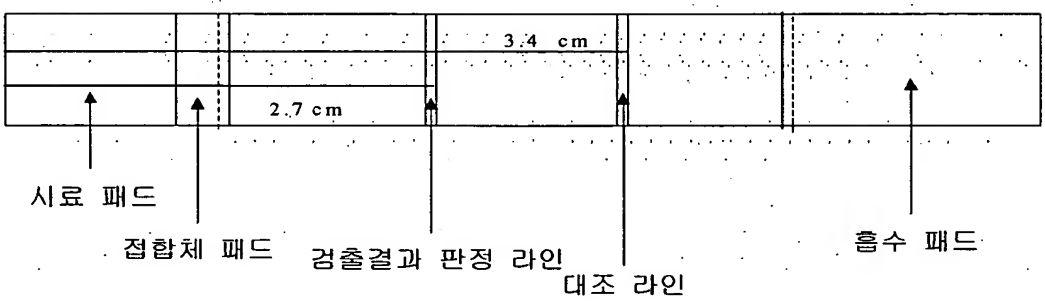
【도 2】



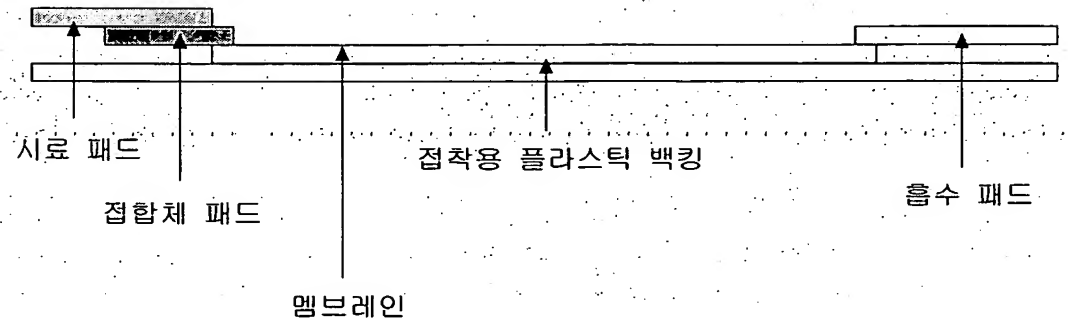
【도 3】


25
2
15
1
05
0
O.D(490 nm)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
희석률(1/10n)
AGP
AsAGP
햅토글로빈
α2-마크로글로불린

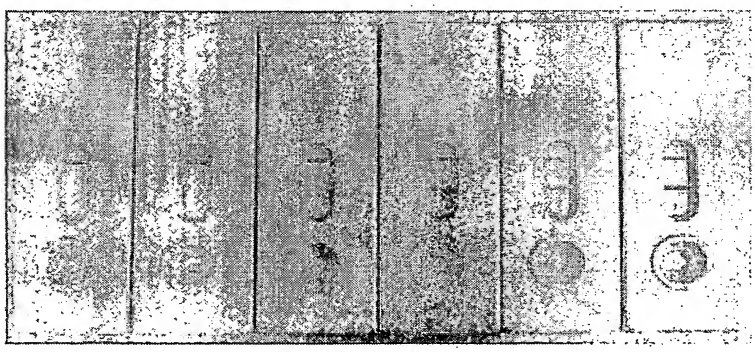
【도 4a】


3.4 cm
2.7 cm
시료 패드
접합체 패드
검출결과 판정 라인
대조 라인
흡수 패드

【도 4b】



【도 5】



1 : α_1-산 당단백질 + 햅토글로빈 + α_2-마크로글로불린
2 : 정상인
3 : 1.5 μg/ml
4 : 2.0 μg/ml
5 : 3.0 μg/ml
6 : 4.0 μg/ml

【서지사항】

【서류명】	명세서 등 보정서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2005.01.28
【제출인】	
【명칭】	네오바이오다임(주)
【출원인코드】	1-2000-033274-0
【사건과의 관계】	출원인
【대리인】	
【성명】	이종우
【대리인코드】	9-1998-000393-3
【포괄위임등록번호】	2000-039816-9
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2002-0084834
【출원일자】	2002.12.27
【심사청구일자】	2002.12.27
【발명의 명칭】	아사이알로 α1-산 당단백질에 대한 단일클론 항체, 이 항체 를 포함하는 아사이알로 α1-산 당단백질에 대한 단일클론 항 체, 이 항체를 포함하는 면역크로마토그래피 스트립 및 이 스 트립을 이용한 아사이알로 α1-산 당단백질 측정 방법
【제출원인】	
【발송번호】	9-5-2004-0459422-73
【발송일자】	2004.10.30
【보정할 서류】	명세서등
【보정할 사항】	
【보정대상항목】	별지와 같음

【보정방법】 별지와 같음

【보정내용】 별지와 같음

【취지】 특허법시행규칙 제13조·실용신안법시행규칙 제8조의 규정에의하여 위와 같이 제출합니다. 대리인 이종우 (인)

【수수료】

【보정료】 3,000 원

【추가심사청구료】 0 원

【기타 수수료】 0 원

【합계】 3,000 원

【보정서】

【보정대상항목】 발명의 명칭

【보정방법】 정정

【보정내용】

【발명의 명칭】

아사이알로 α1-산 당단백질에 대한 단일클론 항체, 이 항체를 포함하는 아사이알로 α1-산 당단백질에 대한 단일클론 항체, 이 항체를 포함하는 면역크로마토그래피 스트립 및 이 스트립를 이용한 아사이알로 α1-산 당단백질 측정방법 {Monoclonal antibody against asialo α1-acid glycoprotein, immunochromatographic strip comprising the monoclonal antibody, and method for diagnosing liver diseases using the immunochromatographic strip}

【보정대상항목】 청구항 1

【보정방법】 정정

【보정내용】

【청구항 1】

수탁번호 KCTC 10261BP로 기탁되어 있는 융합세포주에 의하여 생산되는, 아사이알로 α_1-산 당단백질에만 반응하고 햅토글로빈(heptoglobin)과 α_2-마크로글로불린(α_2-macroglobulin)에는 반응하지 않는 단일클론 항체.

【보정대상항목】 청구항 3

【보정방법】 삭제

【보정대상항목】 청구항 4

【보정방법】 삭제

【보정대상항목】 청구항 5

【보정방법】 삭제

【보정대상항목】 청구항 6

【보정방법】 정정

【보정내용】

【청구항 6】

수탁번호 KCTC 10261BP로 기탁되어 있는 융합세포주에 의하여 생산되는, 아사이알로 α_1-산 당단백질에만 반응하고 햅토글로빈(heptoglobin)과 α_2-마크로글로불린(α_2-macroglobulin)에는 반응하지 않는 단일클론 항체와 아사이알로당단백질을 인지하는 렉틴인 RCA[리시누스 코뮤니스 아글루티닌(Ricinus communis agglutinin)]를 생물학적 시료와 반응시켜 시료 중의 아사이알로 α_1-산 당단백질(AsAGP) 양을 측정하는 방법.

【보정대상항목】 청구항 7

【보정방법】 정정

【보정내용】

【청구항 7】

제6항에 있어서, 단일클론 항체가 수탁번호 KCTC 10261BP의 생쥐 융합세포주에 의해 생산되는 소단위형이 IgG_1인 것이 특징인 시료 중의 아사이알로 α_1-산 당단백질(AsAGP) 양을 측정하는 방법.

【보정대상항목】 청구항 8

【보정방법】 정정

【보정내용】

【청구항 8】

제6항에 있어서, 생물학적 시료가 피검체의 혈액 또는 혈청인 것이 특징인 시료 중의 아사이알로 α_1-산 당단백질(AsAGP) 양을 측정하는 방법.

【보정대상항목】 청구항 9

【보정방법】 정정

【보정내용】

【청구항 9】

수탁번호 KCTC 10261BP로 기탁되어 있는 융합세포주에 의하여 생산되는, 아사이알로 α_1-산 당단백질에만 반응하고 햅토글로빈(heptoglobin)과 α_2-마크로글로

불린(α_2-macroglobulin)에는 반응하지 않는 단일클론 항체와 아사이알로 당단백질을 인지하는 렉틴인 RCA를 함유하여, 시료 중에 존재하는 아사이알로 α_1-산 당단백질의 농도가 1.50㎍/㎖ 이상인 경우에 반응성을 나타내는 간 질환의 가능성 여부를 검사하기 위한 면역크로마토그래피 스트립.

【보정대상항목】 청구항 10

【보정방법】 삭제

【보정대상항목】 청구항 19

【보정방법】 정정

【보정내용】

【청구항 19】

수탁번호 KCTC 10261BP로 기탁되어 있는 융합세포주에 의하여 생산되는, 아사이알로 α_1-산 당단백질에만 반응하고 햅토글로빈(heptoglobin)과 α_2-마크로글로불린(α_2-macroglobulin)에는 반응하지 않는 단일클론 항체와 아사이알로 당단백질을 인지하는 렉틴인 RCA가 고착되어 있는 고상체를 함유하고, 시료 중에 존재하는 아사이알로 α_1-산 당단백질의 농도가 1.50㎍/㎖ 이상인 경우에 반응성을 나타내는 것을 특징으로 하는 간 질환의 가능성 여부를 검사하기 위한 면역분석용 진단킷트.

【보정대상항목】 청구항 20

【보정방법】 삭제

This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☑ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☑ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.
As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.